杨卫军,吕有军,赵兰杰,等. 陆地棉 *GhWOX4* 转录因子的克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):28 - 32.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2018.05.007

陆地棉 *GhWOX4* 转录因子的克隆与生物信息学分析

杨卫军[1], 吕有军[1,2,3], 赵兰杰[2], 张永山[2]
(1. 安阳工学院,河南安阳 455000; 2. 中国农业科学院棉花研究所,河南安阳 455000;
3. 棉花生物学国家重点实验室,河南安阳 455000)

摘要:采用反转录 PCR(简称 RT - PCR)技术从陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)中克隆获得 1 个 *WOX* 基因,命名为 *GhWOX4*(NCBI 登录号:KX900572)。序列分析显示,*GhWOX4* 的开放阅读框为 657 bp,编码含 218 个氨基酸残基的蛋白,具有典型高度保守的同源异型 HD 结构域,属于 *WOX* 转录因子家族。生物信息学分析表明,该基因蛋白相对分子量为 25.19 ku,等电点为 10.04,为不稳定蛋白。二级结构以无规则卷曲为蛋白最大量的结构元件。与其他植物同源基因序列比对显示,其同源区域主要集中在同源异型 HD 结构域。系统进化树分析表明,*GhWOX4* 属于Ⅰ类家族成员,与陆地棉 *Gh_D01G1055*、拟南芥 *AtWOX4* 和可可树 *TcWOX4* 等亲缘关系最近,处于同一个进化分支,推测其可能与之前报道的拟南芥 *WOX* 基因类似,参与植物维管束及花器官发育。

关键词:棉花;*WOX4* 基因;基因克隆;生物信息学
中图分类号: S562.01　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 - 1302(2018)05 - 0028 - 04

WOX(WUSCHEL - related homeobox)基因编码的转录因子家族蛋白在植物的生长发育过程中起着至关重要的作用[1-3]。该家族蛋白含有 1 段能够与 DNA 序列特异结合的由 60 ~ 66 个氨基酸组成的同源异型结构域(home domain,简称 HD),具有调控植物干细胞分裂分化、胚发育、侧生器官发育、顶端分生组织分化和花器官形成等多种重要功能[4-8]。

不同植物中 *WOX* 基因的生物学功能不同,在植物生长发育过程中各自扮演着重要的角色。目前已有报道发现拟南芥基因组中存在 15 个 *WOX*,各个 *WOX* 成员在拟南芥中的功能不同[9]。*AtWUS* 基因与茎尖顶端分生组织发育相关,同时也参与花药和子房发育过程[10-12];*AtWOX3* 基因调控拟南芥花瓣的发育[13],*AtWOX13* 和 *AtWOX14* 基因除了参与拟南芥花器官发育外,还影响拟南芥根发育[14];*AtWOX11* 和 *AtWOX12* 基因共同参与外植体根器官发育[15]。水稻基因组中 *OsWOX1* 是参与调控不定根生长发育的主要基因,对激活冠状根的生长发育具有重要作用[16]。此外,在玉米、茄子、番茄、杨树和高粱等植物中也有关于 *WOX* 基因的报道[9,17-18]。棉花是世界上一种重要的经济作物,其生长发育经历多个阶段。迄今为止,棉花 *WOX* 基因在棉花生长发育过程中的功能未知。本研究以中 69 - 11165 为试验材料,采用反转录 PCR(简称 RT - PCR)技术克隆 *GhWOX4* 基因的 cDNA 全长序列,并进行生物信息学分析,从基因及蛋白结构、序列比对、系统进化树等方面分析该基因的结构和功能,为进一步揭示 *WOX* 转录因子在棉花生长发育过程中的功能奠定了基础。

收稿日期:2016 - 09 - 29
基金项目:河南省科技厅基础与前沿项目(编号:112300410019);棉花生物学国家重点实验室开放课题(编号:CB2014A10)。
作者简介:杨卫军(1977—),男,河南安阳人,硕士,讲师,主要从事植物生理生化与食品加工教学与研究。E - mail:781692734@qq.com。
通信作者:张永山,博士,研究员,主要从事棉花遗传育种研究。E - mail:13938698299@163.com。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　植物材料　陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)中 69 - 11165 由中国农业科学院棉花研究所中熟课题组提供,种植在中国农业科学院棉花研究所东场试验站。从田间植株摘取叶片,用液氮速冻后保存于 - 80 ℃冰箱,用于 RNA 提取。

1.1.2　试剂材料　RNA 提取使用 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒;焦碳酸二乙酯(DEPC)水、氨苄青霉素(AMP)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吲哚 - β - D - 半乳糖苷(X - gal)大肠杆菌(*Escherichia coli*) *Trans1* - T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell、KOD - Plus - Neo、*pEASY* - Blunt Cloning Kit 载体、Maker Ⅲ购自宝生物工程(大连)有限公司;反转录酶 TransScript One - Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司;其他试剂为国产分析纯。引物和 DNA 测序由苏州金唯智生物科技有限公司合成及完成。

1.2　方法

RNA 提取采用 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒,采用 ND1000 紫外 - 可见分光光度计测定 $D_{260\ nm}$ 和 $D_{280\ nm}$,计算 RNA 浓度与纯度。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,保存于 - 80 ℃备用。按照转录酶 TransScript One - Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 说明书合成 cDNA 的第 1 链。

1.2.1　棉花 *GhWOX4* 基因克隆　用拟南芥 AtWOX4(AT1G46480)蛋白序列作为探针,在四倍体陆地棉基因组数据库(http://www.cottongen.org)中通过 Blast 比对发现了 4 个相似性较高的基因 *Gh_D05G1962*、*Gh_A05G1768*、*Gh_D01G1055* 和 *Gh_A01G0998*。由于这些基因在棉花中的功能未知,笔者选取其中 1 个基因 *Gh_D01G1055* 作为研究对

象,用 Primer3 设计扩增开放阅读框的引物(表 1)。以棉花叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系见表 2。

表 1　引物序列

引物名称	序列 (5′→3′)
GhWOX4 – F	ATGGGAAACATGAAGATGCACCAGCT
GhWOX4 – R	TCATCTGCTTTCCGGGTGCAATGGG

表 2　PCR 扩增反应体系

体系成分	加样量 (μL)
KOD – Plus – Neo buffer(10 ×)	5.0
dNTP(2 mmol/L)	5.0
$MgSO_4$(25 mmol/L)	3.0
GhWOX4 – F(10 μmol/L)	1.5
GhWOX4 – R(10 μmol/L)	1.5
cDNA	2.0
KOD – Plus – Neo(1 U/L)	1.0
ddH_2O	31.0
总计	50.0

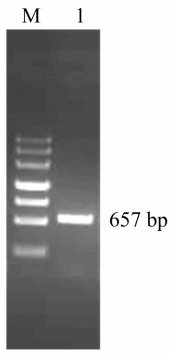
PCR 反应程序:94 ℃预变性 5 min;98 ℃变性 10 s,55 ℃退火 30 s,68 ℃延伸 30 s,32 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖电泳进行检测,回收并纯化后连接至 Peasy – Blunt Cloning Kit 载体,转化大肠杆菌 Trans – T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 感受态细胞,挑取单菌落,摇菌,将鉴定正确的质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.2.2　*GhWOX4* 基因序列的生物信息学分析　用 ProtParam(http://web.expasy.org/protparam/)分析蛋白质的基本理化性质;用在线 HNN 软件(https://npsa – prabi.ibcp.fr/cgi – bin/)在线预测和分析蛋白质的二级结构组成形式;用 EBL – EBI (http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence – search)和 NCBI 的 BlastP 分析氨基酸序列的蛋白质保守区;用 IBS 1.0 软件绘制蛋白结构域图;用 SignalP 和 WOLF PSORT(http://psort.hgc.jp/)进行信号肽及亚细胞定位分析;用 DNAMAN 和 Clustal X 进行多重序列比对及同源性比对;用 MEGA 6.0 软件构建进化树。

2　结果与分析

2.1　陆地棉 *GhWOX4* 基因克隆及序列分析

以拟南芥 AtWOX4(AT1G46480)蛋白序列作为探针,在四倍体陆地棉基因组数据库(http://www.cottongen.org)中发现了 4 个相似性较高的基因 *Gh_D05G1962*、*Gh_A05G1768*、*Gh_D01G1055* 和 *Gh_A01G0998*。由于这些基因在棉花中的功能未知,笔者选取其中 1 个基因 *Gh_D01G1055* 作为研究对象,其基因组序列全长为 1 962 bp,包含长度为 654 bp 的开放阅读框(ORF),以中 69 – 11165 棉纤维 cDNA 为模板,用特异引物 GhWOX4F 和 GhWOX4R 进行 RT – PCR 扩增,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得 1 条 600 bp 左右的目的条带(图 1)。回收目的片段,测序结果分析显示扩增获得的 cDNA 序列包含长度为 657 bp 的开放阅读框,编码 218 个氨基酸,与陆地棉 *Gh_D01G1055* 序列相似性为 99.27%,氨基酸序列一致性为 72.40%,表明陆地棉不同种间核酸序列存在一些差异。鉴于棉花中 *WOX* 基因尚未见到相关研究报道,将其命名为 *GhWOX4*(NCBI 登录号为 KX900572)。



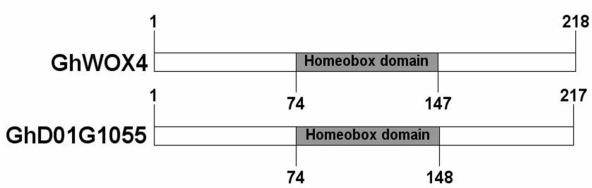
M—Trans2K Plus; 1—*GhWOX4*

图1　*GhWOX4* 基因 RT–PCR 扩增结果

2.2　*GhWOX4* 基因编码蛋白生物信息学分析

从 *GhWOX4* 基因 cDNA 序列推测 GhWOX4 蛋白包含 218 个氨基酸残基,用 ProtParam 预测 GhWOX4 蛋白的基本理化性质。结果表明,GhWOX4 蛋白分子式为 $C_{1119}H_{1\,762}N_{336}O_{311}S_9$,理论分子量为 25.19 ku,理论等电点(pI)为 10.04,酸性氨基酸(Asp + Glu)有 19 个,碱性氨基酸(Arg + Lys)有 36 个;含量最丰富的氨基酸有 Leu(9.2%)、Lys(9.2%)和 Gly(8.3%);脂肪系数为 63.99,总平均亲水性为 0.913,不稳定系数为 58.61,为不稳定蛋白。采用 HNN 在线预测分析 GhWOX4 蛋白二级结构,结果表明,该蛋白主要由 α – 螺旋、延伸直链和无规则卷曲 3 种结构形式构成,其中 α – 螺旋包含 71 个氨基酸,约占 32.57%,延伸直链包含 28 个氨基酸,约占 12.84%,无规则卷曲包含 119 个氨基酸,约占 39.86%。可见,无规则卷曲是该蛋白二级结构的主要组成部分。

为了进一步确定 *GhWOX4* 基因是否属于 WOX 家族,用 EBL – EBI 在线分析,结合 NCBI 中的 BlastP 比对,对该基因氨基酸序列进行蛋白质保守区分析,发现 *GhWOX4* 基因具有 1 个同源异型 HD(第 74 位至第 147 位氨基酸)结构域,该基因属于典型的 WOX 家族成员,其位置如图 2 所示。采用 SignalP 分析 GhWOX4 蛋白信号肽并预测信号肽位点表明,其平均分小于 0.500,最大 *Y* 值预测表明 GhWOX4 蛋白不存在信号肽及切割位点,属于非分泌蛋白(图 3)。由 WOLF PSORT 软件在线预测该蛋白的亚细胞定位情况表明,GhWOX4 蛋白主要定位在细胞质和过氧化物酶体上,在线粒体基质中有少量分布。



黑色区域表示 *GhWOX4* 基因蛋白 HD 结构域

图2　陆地棉 *GhWOX4* 基因与 *Gh_D01G1055* 基因蛋白结构

2.3　GhWOX4 蛋白多重序列比对和蛋白进化树分析

为了解棉花 GhWOX4 蛋白与其他植物 WOX 蛋白的亲缘

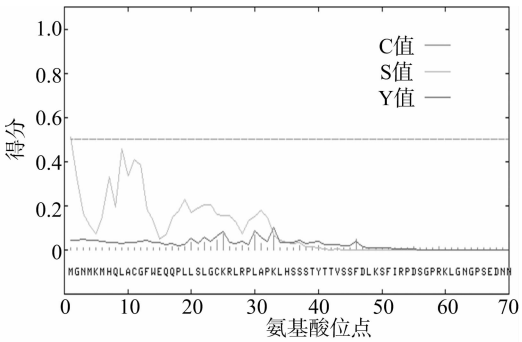


图3　GhWOX4 蛋白的信号肽分析

关系，用 DNAMAN 软件将 GhWOX4 氨基酸序列与 NCBI 上公布的其他植物的 WOX 蛋白进行多重序列比较，结果表明棉花 GhWOX4 与 GenBank 中桑树、番茄等植物的蛋白序列相似性均较低，与拟南芥和可可树相似性较高，与陆地棉 Gh_D01G1055 氨基酸序列相似性最高，其同源区域主要集中在同源异型 HD 结构域，进一步确定该基因属于 WOX 家族成员，如图 4 所示。基于棉花 *GhWOX4* 及其他植物 *WOX* 基因蛋白序列构建系统进化树，分析结果表明，棉花 *GhWOX4* 基因同陆地棉 *Gh_D01G1055* 基因、拟南芥 *AtWOX4* 基因、可可树 *TcWOX4* 基因、番茄 *SlWOX4* 基因等在同一个进化分支上，属于 WOX4 亚家族，如图 5 所示。

3　结论与讨论

与其他植物相比，棉花中大多数的 *WOX* 基因仍未被克隆及研究，本试验通过 RT－PCR 技术克隆了陆地棉中 1 个 *WOX* 基因 *GhWOX4*。氨基酸序列分析和蛋白结构域分析表明，*GhWOX4* 基因含有典型的 HD 同源异型结构域，并且与拟南芥 *AtWOX4* 基因、可可树 *TcWOX4* 基因等具有很高的序列同源性，因此属于 *WOX* 基因家族。

系统树分析表明，*GhWOX4* 基因属于 *WOX* 基因家族的Ⅰ类亚家族成员，与陆地棉中 Gh_D01G1055 蛋白、拟南芥 AtWOX4、可可树 TcWOX4、番茄 SlWOX4 等在同一个进化分支上。有研究表明，拟南芥 *AtWOX4* 基因在维管束形成层和原形成层表达，促进形成层和原形成层分化，影响植物的次生生长[19]。沉默 *OsWOX4* 后，水稻茎尖分生组织发育异常，植株矮小，株型异常，叶片失绿发黄[20]。*OsWOX4* 除了参与维管束发育，在花的分生组织和花序中也有很高的表达水平[20]。番茄中过表达 *SlWOX4*，其筛管和导管数量明显增多[21]。经高温胁迫处理后番茄通过相应的信号转导途径抑制了 *SlWOX4* 的表达水平，表明番茄可能通过调节 *SlWOX4* 在器官组织中的表达水平来调控其发育进程来响应高温干旱环境[18]。

通过其他植物 *WOX4* 基因功能研究发现，*WOX4* 不仅参与维管束及花器官发育，同时对逆境胁迫具有一定的应答机制。本研究表明，*GhWOX4* 基因属于 *WOX* 转录因子家族，具体功能有待利用分子生物学手段进行进一步分析验证，最终为阐明 *WOX* 转录因子在棉花生长发育中的功能和机制奠定基础。

参考文献：

[1] Laux T, Mayer K F, Berger J, et al. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* [J]. Development, 1996, 122(1): 87－96.

[2] Haecker A, Grosshardt R, Geiges B, et al. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*[J]. Development, 2004, 131(3): 657－668.

[3] van der Graaff E, Laux T, Rensing S A. The WUS homeobox－containing (WOX) protein family[J]. Genome Biology, 2009, 10(12): 248.

[4] 王占军，陈金慧，施季森. 植物干细胞中 WUS/CLV 反馈调控机制的研究进展[J]. 林业科学，2011，47(4)：159－165.

[5] Yadav R K, Reddy G V. WUSCHEL protein movement and stem cell homeostasis[J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(5): 592－594.

[6] 高　丽，孙祎敏，邵铁梅，等. 植物 WUSCHEL－related homeobox (WOX)家族研究进展[J]. 生物技术通报，2015，34(5)：7－12.

[7] 王俞程，何瑞萍，彭献军，等. WOX 转录因子家族研究进展[J]. 草业科学，2015，32(5)：760－769.

[8] Ueda M, Zhang Z, Laux T, et al. Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development[J]. Developmental Cell, 2011, 20(2): 264－270.

[9] Zhang X, Zong J, Liu J, et al. Genome－wide analysis of *WOX* gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and poplar[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(11): 1016－1026.

[10] Gross－Hardt R, Lenhard M, Laux T. WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development [J]. Genes & Development, 2002, 16(9): 1129－1138.

[11] Deyhle F, Sarkar A K, Tucker E J, et al. *WUSCHEL* regulates cell differentiation during anther development [J]. Developmental Biology, 2007, 302(1): 154－159.

[12] Gallois J L, Nora F R, Mizukami Y, et al. *WUSCHEL* induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem [J]. Genes & Development, 2004, 18(4): 375－380.

[13] Vandenbussche M, Horstman A, Zethof J, et al. Differential recruitment of *WOX* transcription factors for lateral development and organ fusion in petunia and *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2009, 21(8): 2269－2283.

[14] Deveaux Y, Toffano－Nioche C, Claisse G, et al. Genes of the most conserved WOX clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis*[J]. BMC Evolutionary Biology, 2008, 8(1): 291.

[15] Liu J C, Sheng L H, Xu Y Q, et al. *WOX11* and *12* are involved in the first－step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2014, 26(3): 1081－1093.

[16] Zhao Y, Hu Y F, Dai M Q, et al. The WUSCHEL－related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot－borne crown root development in rice[J]. The Plant Cell, 2009, 21(3): 736－748.

[17] 韩洪强，刘　杨，周子路，等. 茄子 *SmWOX13* 基因的克隆、亚细胞定位及序列分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版)，2015，33(2)：1－8，17.

[18] 李晓旭，刘　成，李　伟，等. 番茄 WOX 转录因子家族的鉴定及其进化、表达分析[J]. 期刊名称缺失，2016，38(5)：444－460.

[19] Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(8): 2618－2629.

[20] Ohmori Y, Tanaka W, Kojima M, et al. *WUSCHEL－RELATED HOMEOBOX4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the CLE gene *FCP1* in rice[J]. The Plant Cell, 2013, 25(1): 229－241.

```
GhWOX4       ..MG......NMKMHQIACGF...WEQQ...PLLSLGCKRLRPIAPKLHSSSTYTTVSS.......FDLKSFIRPDSG..PRKLGNGPSEDNNRHSP...    74
Gh_D01G1055  ..MG......NMKMHQIACGF...WEQQ...PLLSLGCKRLRPIAPKLHSSSTYTTVSS.......FDLKSFIRPDSG..PRKLGNGPSEDNNRHSP...    74
TcWOX4       ..MG......NMKVHQIARGF...WEHE...PSLSLGCKRLRPIAPKIATS.TDNTVSS.......FDLKSFIRPESG..PRKLG...PLDEKRDSP...    70
PtWOX4       ..MG......SMKVHQIARGF...WEHE...PSLTLGCKRLRPIAPKLANT..DHSVTS.......FDLKSFIRPDSG..PRKIA...SSDEKKDSP...    69
PtWOX4b      ..MG......SMKVHQIARGF...WEHE...PSLTLGCKRLRPIAPKLANT..DHSVTS.......FDLKSFIRPDSG..PRKIA...SSDEKKDSP...    69
GmWOX4       ..MG......SMKVHQFTRGFC..WEHE...PFLTLGCKRLRPIAPKLFNTQTNTIPTTP...SVPFDLKSFIRPESG..PRKFVS..SDDSKKDPPSPQ    80
PtWOX4a      ..MG......SMKVHQIARGF...WEHE...PFLTLGFKRLRPIAPKLANT..DHSAAS.......FDLKSFIRPDSG..PINIA...SSDEKKDSP...    69
SlWOX4       MYMGSSSGSLSMKVHQFTRGF...LEHEAASPSLTLGCKRLRPIAPKINTTNNDTTTTIV...TPPFDLKSFIRPESSNSPPKIA...YNEDKKDSS...    88
AtWOX14      .......MVKKKKEKEKSKEIEEMDREICNGAYSG......RVMTEECMEILRKQIAVYAVICDQIVLLHNSLSSYHPLSSGVRP...MVGGYFDFMGAS    84
AtWOX10      ........................MEQESINGRYGS......RVMTDECMETLRKQIAIYAVLCDQIVFLHNSLSSVPLLSSGMNP...MRGEYFDFMVAS    68
AtWOX4       ..........MKVHEFSNGFSSSWDQHDSTSSLSLSCKRLRPIAPKLSGSPPSPSSSSCVTSATFDLKNFIRPDQTG.PTKFE......HKRDPP...    79
AtWOX6       ..MGYISNNN.......................LINYLPLSTTQPPLLLTHCDINGND.........HHQLITASSG..EHDID.....ERKNNIP...    55
AtWOX3       ..........................................................................................              0
AtWOX9       ..........................................MASSNRHWPSMFKSKPHP..HQWQHDINSP..LLPSAS............HRSSPFSSGC    44
AtWOX11      ..........................................................................MDQEQTPHSPTR............HSRSPPSSAS    22
AtWOX5       ..............................................MS.......................FSVKGRS.....LR.....GNNNGG....    17
AtWOX1       ..........MWIMGYNEGG..........ADSFNGGRKLRPLIPRLTSCPTAAVNTNS...DHRFNMAVVTMTAEQ...NKREIMMINSEPQHPP...    70
AtWOX13      ......MMEWDNQLQENNHHSSNLQGIDVNGGSGAGGGMYVKVMTDEQYETLRKQIAIYGTICERIVEMHKTLTAQQDIAGGR.....MGGLYADFMMSS    89
AtWOX7       ..........................................MSS.................RGFNIKARG.....LC.....NNNNGGG...    21
AtWOX12      ..........................................................................WNQEGASHSPS.....................    11
AtWOX8       ..........................................MSSSNKNWPSMFKSKPCNNNHHHQHEIDTPSYMHYSNC............NLSSSFSS..    46
AtWOX2       ..........................................MENEVNAG........................................              8
AtWUS        ..........................................MEPPQHQHHHHCADQESGN..........NNNNKSGSG.....................    28
Consensus

GhWOX4       .FVETHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYRG.GMRTINAQQIEQTTECLGKYGKIEGKNVFYWFCNHKARGETKAEAKQ...FWTHPLSQKLC..........    159
Gh_D01G1055  .FVETHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYRG.GMRTINAQQIEQTTEKLGKYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRS...SLGLTHCPRSS..........    158
TcWOX4       .CVETHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYRG.GMRTINAQQIEQTTAQLGKYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRN...SLGINHCPRSS..........    154
PtWOX4       .QGETHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYRG.GMRTINGQQIEDTTAQLSRYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRN...SLGLSHSPRTP..........    153
PtWOX4b      .QGETHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYRG.GMRTINGQQIEDTTAQLSRYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRN...SLGLSHSPRTP..........    153
GmWOX4       GCVETHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYKG.GIRTINAQQIEQTTVQLGKYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRN...SLAFSHSPRTH..........    165
PtWOX4a      .QGEAHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYRG.GMRTINGQQIEDTTAQLSRYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRN...SLGLSHSPRTP..........    153
SlWOX4       .CVESHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYRG.GMRTINAQQIEQTTAQLGKYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRN...SLGLSQSPRTP..........    172
AtWOX14      SSSHRISTRRWTFTSTCLQIIESIYDE.GSGTINRRRIREIATELSEHGQITETNVYNWFCNRRAR.SKRKQP........QTTTANG......CA...    165
AtWOX10      SSAHGMSTRRWTFTTTCLQIIENIYKE.GSGTINPRRIKETTMELSEHGQIMENVYHWFCNRRAR.SKRKQP........PTTTITSS.....CA...    150
AtWOX4       HQLETHPGGTRWNFTQECIGIIEMLYKG.GMRTINAQQIEHTTLQLGKYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKRNNLISLSCQSSFTTTGVFNPSV...    174
AtWOX6       .....AAATRWNFTPECITTIEELYRS.GTRTITTEQIQQIASKLRKYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERLKRRRREGGAIIKPHKDVKDSSSGGHR...    145
AtWOX3       ...MSFVASTRWCFTPECIMIIEEMYRS.GIRTINAVQIQQITAHIAFYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.DRQKLRKKIAKQLHQQQHQLQLQLQQIKP...     92
AtWOX9       EVERSPEPKERWNFKPECIRIIEAIFNS.GMVNPREEIRRIRAQLQEYGCVGDANVFYWFCNRKSRSKHKLRLLHNHSKHSLPQTQPQPQPQSASSSS    143
AtWOX11      GSTSAEFVRSRWSFKPECILIIESIFHS.GMVNPKEETVRIRKMLEKFGAVGDANVFYWFCNRRSRSRRRQRQLCAAAAAADATINTCDQTMMVS....    117
AtWOX5       ....TGTKCGRWNFVPCLKIITDLFRA.GLRTPTTDQIQKISTELSFYGKIESKNVFYWFCNHKAR.ERQKRRKIS...IDFDHHHHQP..........     98
AtWOX1       .....VMVSSRWNFTPDCLRVIEELYRQ.GTRTPSADHIQQITAQLRRYGKIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKRRRQ..METGHEETVLSTAS...IV...    155
AtWOX13      LG.HKMTARQRWTFTVCLQIIERIFDQ.GTGTPSKQKIKDTTEELSQHGQIAEGNVYNWFCNRRAR.SKRKQHGG.....GSSGNNNGE.....SE...    173
AtWOX7       ...GTGAKCGRWNFVPCVKLITDLFKA.GLRTPSTDQIQKISMELSFYGKIESKNVFYWFCNHKAR.ERQKCRKIST..VKFDHRQDT...........    103
AtWOX12      .STSTEFVRARWSFKPECILIIESIFNS.GTVNPPKDETVRIRKMLEKFGAVGDANVFYWFCNRRSRSRRRHRQLIAATIAAATSIGAEDHQHMTA....    105
AtWOX8       ..DRIPDPKERWNFKPECIRIIESIFNS.GTINPPREEIQRIRIRIQEYGQIGDANVFYWFCNRKSRAKHKLRVHHKSPKMSKKDKTVIP..........    133
AtWOX2       .....TASSSRWNFTKDCITLIENLYKE.GIRTPSADQIQQITGRIRAYGHIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKQKQERMAYFNRLLHKTSRFFYPPPC...     98
AtWUS        .GYTCRQTSTRWTFTECIKIIKELYYNNAIRSPTADQIQKITARIRQFGHIEGKNVFYWFCNHKAR.ERQKKRFNG.TNMTTPSSSENSVMMAAND...    122
Consensus              rw p   q   l           p     i   l   g     nv  wfqn   r

GhWOX4       ........SHYSN.KLWILG.RKQWKERRI........VHVRGSAEAG.......HLR...KKIADR.......................QVKKM.....    203
Gh_D01G1055  ........APIT..PITLDT.RVETMEREE.......DSPCKRKCRSW.......SFE...EEDSRS.......................SSKED.....    202
TcWOX4       ........APIT..TITLDT.RVEIMEREE.......DSPYKRKCRSW.......SFEYL.EEESRS.......................SCKEE.....    200
PtWOX4       ........SPIT..IISLDT.RGE.VEKDE.......DSPYKRKCRSW.......SFECF.ELEESR.......................SCKEE.....    198
PtWOX4b      ........SPIT..IISLDT.RGE.VEKDE.......DSPYKRKCKSW.......SFECF.ELEESR.......................SCKEE.....    198
GmWOX4       ........TIHS..IVTLETTRGEVVERDHEE.....DSPYKKKCRFW.......VFECLEEQNMSS.......................ACEQE.....    215
PtWOX4a      ........SFVT..IISLDT.RGE.VEREE.......DSPYKRKCRSW.......AFECL.ELEDSR.......................SCREK.....    198
SlWOX4       ........SAIVTSPLSFDT.RGE.VVRDE.......DSPYKRKCRGW.......TFEYMEEEQQQQDE...............E...EIINCREN.....    226
AtWOX14      ........DDVAVTT.EERRSCGD.............SGGLES.................YEHILFPSPD...............LG..............    198
AtWOX10      ........DDAAVTTTEERGRCGDD............SGGFES.................YEHILFPSPD...............LG..............    185
AtWOX4       ........TMKTRTSSSLDIMREFMVEKEEIVE....ENEYKRTCRSW.......GFENLEIENRRNKN..............SSTMATTFNKII.....    236
AtWOX6       ........VDQTKLCPSFPHTNRPQPQHELDFAS..YNKDNNANNEDH.......GTTEESDQRASEVG.......................KYATWR.....    203
AtWOX3       ........KPIS..SMISQFVNKNIIDHNPYHHH.HNHHHNHHHRPY.......DHMSFDCCSHPSFM...................CLPHQCTGVGEA.....    155
AtWOX9       SSSSSSSKSTKPRKSKNKNNTNLSLGGSQMMGMFPPEFA.FLPFVSTVGGFEGITVSSQLGFLSGDMIEQQQKEAPTCTGLLLSEIMNGSVSYGTHHQQHL    242
AtWOX11      ........NSLPHHSGS....DLGFGGCS.......TSSNYLFGGSS........QVPSFFLGLSSSPSSCSSSSSTSSSASSSSSYG.GGCDNQ.....    184
AtWOX5       ........STRDVFEISEEDCQEEEKVIETLQLFP.VNSFEDSNSKVD.......KMRARGNNQYREYI..............RETTTTSFSPYS.....    163
AtWOX1       ........SNHGFDKKDPPGYKVECVKNWICSVG..CDTQPEKPSRDY.......HLEEFANIRVEHNA..............RCGGDERRSFLG.....    219
AtWOX13      ........VETEVEAINEKRVVRPESLLGLPDGNS.NNNGLGTTTATT.......TAPRPEDLCFQSPE..............ISSDLHLLDVLS.....    238
AtWOX7       ............DLSKP.....................RRDNVRRH.......QLFAKG.......................................    122
AtWOX12      ........MSMHQYPCSNNEIDLGFGSCSN......LSANYFINGSSS......SQIPSFFLGLSSSS.......................GGCEN.....    158
AtWOX8       ........STDADHCFGFVNQETGLYFVCNNEIVVTEFAGFLFFVHND......PSAAQSAFGFGDFVV...EVVTEEGMAFSTVNNG.VNLETN.....    210
AtWOX2       ........SNVGCVSPYYLQCASDHHMNQHGSVYT.NDLLHRNNVMIP.......SGGYEKRTVTQHQK..............QLSDIRTIAATR.....    163
AtWUS        ........HYHPLLHHHHGVFMQRFANSVNVKLNQ.DHHLYHHNKPYP.......SFNNGNINHASSGT..............ECGVVNASNGYM.....    187
Consensus

GhWOX4       ....KTEIWELFPLHP.....................ESR.............................................................    218
Gh_D01G1055  ....ENRTLELFPLHP.....................ESR.............................................................    217
TcWOX4       ....ENRTLELFPLHP.....................EGR.............................................................    215
PtWOX4       ....GDRTLELFPLHP.....................EGR.............................................................    213
PtWOX4b      ....GDRTLELFPLHP.....................EGR.............................................................    213
GmWOX4       ....EHRTLELFPLHP.....................EGR.............................................................    230
PtWOX4a      ....GDRTLELFPLHP.....................EGR.............................................................    213
SlWOX4       ....GDRTLQLFPLHP.....................EGMR............................................................    242
AtWOX14      .......IEHLLSIGK.....................FMET............................................................    211
AtWOX10      .......IEHLINRDK.....................FID.............................................................    197
AtWOX4       ....DNVTLELFPLHP.....................EGR.............................................................    251
AtWOX6       ....NLVTWSITQQPE.....................EINIDENVNGEEEETRDNRTINLFFVREYQEKTGRLIEKTKACNYCYYYEFMPLKN......    271
AtWOX3       ....PSKVMNEYYCTK.....................SGAEEIIMQKSITGFNSSYGRDWMMMDMGPRPSYPSSSSSPISCCNMMMSSPKIPLKTELL    229
AtWOX9       SEKEVEEMRMKMLQQPQTQICYATTNHQIASYNNNNNNNNIMLHIPPTTSTATTITTSHSIATVPSTSDQLCVCADARIRVFINEMELEVSSGPFNVRDA    342
AtWOX11      ...SNSGMENLLTMSG.....................QMSYHEATHHHYCNHSSNVTSILCPSDCNSNFQY.QQGAITVFINGVPTEVTRGGIDMKAT    257
AtWOX5       ....SCGAEMEHPPPL.....................DLRLSFL...........................................................    182
AtWOX1       ....INTTWCMMQLPP.....................SFYSSSHHHHQRNLIINSPTVSSNMSNSNNAVSASKDTVTVSFVFLRTREATNTETCHRNGD    293
AtWOX13      ....NPRDEHIVGKMG.....................IAESYNLYDHVEDYGMSG.............................................    268
AtWOX7       ..........................................................................................              122
AtWOX12      ....NNGMENLFKMYG.....................HESDHN...HQQQHHSSNAASVINPSDCNSNSQYEQEGFMTVFINGVFMEVTKGAIDMKTM    228
AtWOX8       ..ENFDKIFAINLYGG.................DGNGGNCFPPLTVPLTINQSQEKRDVGLSGGEDVGDNVYP...VRMTVFINEMPIEVVSGLFNVKAA    289
AtWOX2       ....MPISPSSLRFDR.....................FALRDNCYAGEDINVNSSGRKTLPLPLQPINASNADGMGSSSFALGSDSFVDCSSDGAGREQ    237
AtWUS        ....SSHVYGSMEQDC.....................SMNYNNVGGGWANMDHHYSSAPYNFFDRAKPLFGLEGHQEEEECGGDAYLEHRRTLPLFFMH    261
Consensus

GhWOX4       ..........................................................                                                218
Gh_D01G1055  ..........................................................                                                217
TcWOX4       ..........................................................                                                215
PtWOX4       ..........................................................                                                213
PtWOX4b      ..........................................................                                                213
GmWOX4       ..........................................................                                                230
PtWOX4a      ..........................................................                                                213
SlWOX4       ..........................................................                                                242
AtWOX14      ..........................................................                                                211
AtWOX10      ..........................................................                                                197
AtWOX4       ..........................................................                                                251
AtWOX6       ..........................................................                                                271
AtWOX3       FPISSINSKQDSTKL...........................................                                                244
AtWOX9       FGEEVVLINSAGQPIVTDEYGVALHPLQHGASYYLI......................                                                378
AtWOX11      FGEDIVIVHSSGVPLPTDEFGFIMHSLQHGEAYFIVPRQT..................                                                297
AtWOX5       ..........................................................                                                182
AtWOX1       DNKDQEQHEDCSNGELDHQEQTLELFPLRKEGFCSDGEKDKNISGIHCFYEFLPLK                                                349
AtWOX13      ..........................................................                                                268
AtWOX7       ..........................................................                                                122
AtWOX12      FGDDSVLLHSSGLPLPTDEFGFIMHSLQHGQTYFIVPRQT..................                                                268
AtWOX8       FGNDAVLINSFGQPILTDEFGVTYQPLQNGAIYYLI......................                                                325
AtWOX2       PFIDFFSGGSTSTRFDSNGNGL....................................                                                259
AtWUS        GEDHINGGSGAIWKYGQSEVRPCASLELRIN...........................                                                292
Consensus
```

图4　GhWOX4 与拟南芥等其他植物 WOXs 蛋白氨基酸序列多重序列比对

刘义存,黄天启,林顺权. 枇杷属若干野生种叶片愈伤组织诱导和再分化[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):32 – 35.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2018.05.008

枇杷属若干野生种叶片愈伤组织诱导和再分化

刘义存[1,2], 黄天启[2], 林顺权[2]
(1. 仲恺农业工程学院,广东广州 510225; 2. 华南农业大学园艺学院,广东广州 510642)

摘要:以枇杷属 5 个野生枇杷种、1 个杂交后代的叶片为外植体,研究植物生长调节剂配比以及环境培养条件对叶片愈伤组织诱导和再分化的影响。结果发现,5 个种愈伤诱导率达到了 100%;最佳的诱导条件:在 18 ℃下暗培养 10 d 后再转至全光照,培养基配方为 MS + 0.2 mg/L 6 – BA + 0.2 mg/L KT + 1.0 mg/L 2,4 – D;KT 和 TDZ 的组合使栎叶枇杷叶片愈伤组织产生胚状体,诱导率最高为 21.43%,生根率为 20.0%。本试验结果将为枇杷野生种的离体再生等生物技术研究提供一定的技术支撑。

关键词:枇杷属植物;野生种;叶片愈伤组织;生长调节剂;诱导;再分化
中图分类号: S667.304^{+}.3　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 – 1302(2018)05 – 0032 – 04

枇杷属(*Eriobotrya*)隶属于蔷薇科(Rosaceae)苹果亚科(Maloideae),原产于我国南方地区以及与我国西南毗邻的东南亚几个国家,共约有 30 余个种或变种。我国的野生枇杷种数约占世界的 2/3,但根据多年来的调查发现,野生枇杷资源正逐渐减少[1-4]。从 20 世纪 80 年代开始,我国就开始了一些关于枇杷叶片细胞工程及离体培养的研究,如原生质体培养[5-7]、胚乳愈伤组织诱导[8]、叶片培养和愈伤组织诱导不定芽[9-11]。虽然不断取得一些新进展,但迄今为止绝大多数报道都是关于栽培枇杷研究,而关于野生枇杷的叶片诱导愈伤组织、愈伤组织诱导再分化的系统研究还未见报道。为此,通过借鉴前人对普通枇杷叶片诱导愈伤组织的经验,将研究建立相对可靠而普适的野生枇杷叶片离体培养诱导愈伤组织和再分化技术体系,旨在为枇杷属栽培枇杷之外的各种枇杷种质资源离体保存、离体再生、细胞工程、转基因等研究提供技术支持。

收稿日期:2016 – 10 – 22
基金项目:广东省科技基础条件建设项目(编号:2014A030304057、2015A030303015);广东省广州市科技创新委资助华南农业大学国家重点实验室项目(编号:201504010028)。
作者简介:刘义存(1979—),男,广东潮州人,博士,讲师,主要从事园艺植物种质资源与生物技术研究。E – mail:373821312@qq.com。
通信作者:林顺权,男,福建莆田人,博士,教授,主要从事园艺植物种质资源、遗传育种与生物技术研究。E – mail:loquat@scau.edu.cn。

1　材料与方法

1.1　材料

以枇杷属植物 5 个种、1 个属间杂种为试材(表 1),所有材料均来自华南农业大学枇杷属种质资源圃。

1.2　方法

1.2.1　叶片的接种　从胚离体培养成功 3 个月后的试管苗中,以栎叶枇杷、台湾枇杷、台湾枇杷恒春变型、南亚枇杷窄叶变型、香花枇杷和石斑木 × 台湾枇杷等 6 个种的叶片为试材,

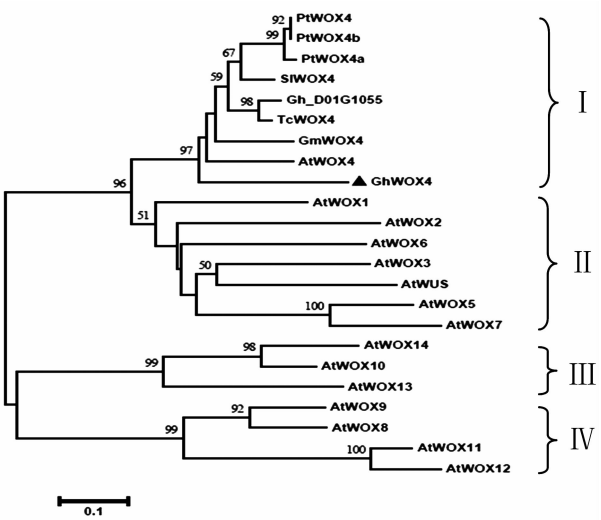


图5　陆地棉GhWOX4 蛋白与其他植物 WOXs 蛋白系统进化树

[21]Ji J B, Strable J, Shimizu R, et al. *WOX4* promotes procambial development[J]. Plant Physiology, 2010, 152(3): 1346 – 1356.